

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 14 年度博士課程 進学

氏名 提箸 祥幸

指導教員名 太田 明德

論文題目 酵母 *Candida maltosa* における *n*-アルカンの取り込みと
長鎖ジカルボン酸の排出に関する研究

微生物を用いた物質生産は、化学合成による物質生産に比べ化石燃料の消費が少なく、反応時の副生物が少ないため、環境への配慮という点で優れているとされる。アルカン資化性酵母 *Candida maltosa* は *n*-アルカンを唯一の炭素源として生育することができ、代謝の過程に生ずる中間代謝産物の中には工業的に利用価値の高い、有用な物質が含まれている。*C. maltosa* の石油系の炭化水素を炭素源として資化できる能力を利用することによって、*Saccharomyces cerevisiae* のような糖質を原料とする発酵生産では得られないような物質を生産することが期待される。また、長鎖ジカルボン酸 (DCA) 生産株は、低レベルの DCA 生産能を持つ *C. maltosa* の野生型株より、株式会社ジャパンエナジーによって多段階の変異誘発処理—選抜を経るスクリーニングにより得られた。この株は長鎖 ($nC_{10}\sim nC_{18}$) の *n*-アルカンを資化し、長鎖の DCA を高生産するように改良されている。炭素数 10 以上の DCA は合成繊維、機能性樹脂、耐寒性可塑剤や合成潤滑油などの原料をはじめとして医薬、農薬、香料などのファインケミカル分野に至るまで幅広い用途の可能性を持つ重要な化学品である。長鎖 DCA のうち経済的な化学合成法がすでに確立されているものは少なく、微生物を利用した発酵法が期待されている。そこで本研究では、*C. maltosa* の DCA 高生産株を用い、アルカン代謝物の動態、特に細胞内へのアルカンの取り

込み、及び生産物である DCA の細胞外への排出機構に注目し解析を行った。

1. *n*-アルカンの細胞内への取り込みについて

n-アルカンは疎水性の極めて高い、水に難溶の物質である。*Candida* 属酵母をはじめ、*Yarrowia lipolytica* ではアルカンの水系への分散を容易にする生物系界面活性剤が分泌されることが示されている。しかし、界面活性剤による分散後にアルカンがどのように細胞内に取り込まれるのかについては明らかとなっていない。

そこで、アルカンがエネルギー依存的に細胞内へ輸送されていることが推定されている *Y. lipolytica* のアルカン取り込みについてさらに解析を進めると共に、同じく *n*-アルカン資化性酵母である *C. maltosa* における取り込みについて解析を行った。*C. maltosa* は経時的にアルカン *n*-[¹⁴C]ヘキサデカンを蓄積し、KCN によって取り込みが阻害され、さらにグルコース添加による取り込みの抑制が観察された。これらのことから、*C. maltosa* はエネルギー依存的にアルカンを細胞内へ取り込むことが強く示唆され、また、その取り込みはグルコースによるカタボライト抑制を受けることが示された。さらにこのアルカンの取り込みは、アルカンの存在により誘導されることも観察された。

2. ABC トランスポーターをコードする遺伝子 *CmCDRI* の取得

DCA 実用高生産株はアルカンを代謝し、およそ 130 g/ml もの DCA を菌体内ではなく培地中に蓄積する。それ故、DCA 高生産株は何らかの DCA の細胞外への排出機構を獲得しているものと考えられた。DCA 生産株では、シクロヘキシミドなどのある種の ABC トランスポーターの輸送基質となることが報告されている抗生物質に対して、野生型株よりも耐性を示すことを明らかにした。また、DCA 生産条件の培養をしている菌体はさらに強い薬剤耐性能を示した。このことから、DCA 高生産株は薬剤耐性を付与するような ABC トランスポーターによって、DCA を菌体外へ積極的に排出していることが予想された。

C. maltosa の DCA 生産への ABC トランスポーターの関与について解析するため、*C. maltosa* の ABC トランスポーター遺伝子の取得を試みた。まず、酵母における ABC トランスポーターに高度に保存されている領域から PCR プライ

マーを設計し、*C. maltosa* のゲノムに対し PCR 増幅を試み、*C. maltosa* における ABC トランスポーター遺伝子断片を複数得た。その中で DCA 高生産株において DCA 生産条件での培養時に強く発現が誘導される遺伝子断片をプローブとして、*C. maltosa* の遺伝子ライブラリーを用いてコロニーハイブリダイゼーションを行い、6 種の ABC トランスポーターと予想される遺伝子断片を得ることに成功した。その中でも最も強く DCA 生産株の DCA 生産培養条件において mRNA レベルが上昇する ABC トランスポーター遺伝子は、*Candida albicans* *CDRI* と高い相同性を示したことから、*CmCDRI* と命名した。

CmCDRI は DCA 高生産株において DCA 生産培養時に顕著に mRNA レベルが上昇する他、DCA 高生産株では DCA の培地中への添加に強く応答し、mRNA 量が上昇することが認められた。これらのことから、*CmCDRI* は DCA 高生産株における DCA の排出に関与している可能性が示唆された。さらに、*CmCDRI* はシクロヘキシミドによって強く発現が誘導され、miconazole に対しても弱い発現誘導が観察された。このことは DCA 高生産株と野生型株との表現型の違いと矛盾しない。

3. *CmCDRI* と DCA 生産について

CmCDRI の発現解析から、DCA 高生産株における DCA の菌体外排出に ABC トランスポーター *CmCDRI* が関与していることが強く示唆された。そこで *CmCDRI* の高発現株ならびに破壊株の作製を試み、DCA 生産に与える影響について解析した。*CmCDRI* 高発現株は多コピーベクターにプロモーター領域を含む *CmCDRI* 全長をクローン化することで作製した。ノーザン解析による発現解析により、*CmCDRI* 高発現株はシクロヘキシミドの培地中への添加に対しベクターのみのコントロール株に比べて、平均して 18.5 倍もの転写量を示した。また、*CmCDRI* 高発現株は対照株に比べ、シクロヘキシミドに対してより耐性を示すことも明らかとなった。試験管培養の条件において、*CmCDRI* 高生産株は対照株に比べておよそ 20~40% の DCA 生産量の上昇が観察された。さらに、DCA 生産培養中に出現が報告されている DCA 生産能を失った復帰変異株の出現率を、*CmCDRI* 高発現株は対照株に比べて 1/2 以下に低く抑えることが観察された。加えて、*CmCDRI* 高生産株では対照株に比べて、アルカンの初発酸化酵素である *ALK1*、 ω -酸化を触媒する *ALK5* の DCA 生産に重要な両酵素が DCA

生産期に強く誘導され続けていることが示された。これらのことから、*CmCDRI* の高発現により、生産された DCA 及び他のアルカン代謝物の菌体外への排出が促され、DCA 生産量が上昇するとともに、細胞内では *n*-アルカンの円滑な代謝が細胞内で維持されているものと考えられた。さらには、細胞内に DCA 等アルカン代謝物が蓄積するという、菌体にとって負荷のかかる状態を脱することで、復帰変異株の出現も *CmCDRI* 高発現株においては抑えられていると考えられる。

まとめ

本研究において、*C. maltosa* におけるアルカンの細胞内への取り込みと、アルカン代謝産物である DCA の生産における ABC トランスポーターの役割に関して新たな知見を得た。また、今後のジャー培養による DCA 生産試験による確認が必要であるが、生産物の排出機構を増進・改良することで生産量を増大させる戦略において、本研究によって示された、ABC トランスポーターでの知見は今後の発酵生産分野で新たなツールとなると期待される。